

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「胚細胞ヒストンによるリプログラミング
機構」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:石井 俊輔
((独)理化学研究所石井分子遺伝学
研究室、上席研究員)

§ 1. 研究実施の概要

(1) 実施概要

卵子への核移植によるクローン個体の作製は、卵子には全能性細胞を作製できる特異的なリプログラミング因子が存在することを示唆している。しかし卵子特異的なリプログラミング因子については不明な点が多い。一方、山中因子による iPS 細胞の作製は、ES 細胞で発現の高い転写因子を発現させて、ES 細胞の遺伝子発現ネットワークを樹立する方法である。iPS 細胞は ES 細胞に比べ質的に多様であり、良質な iPS 細胞を選ぶためには高いコストと長い時間を要する。従って、卵子特異的なリプログラミング因子を用いて、全能性細胞を経て iPS 細胞を作製できれば、この問題を克服できる可能性がある。私達は卵子に多く存在する2つのヒストンバリエントに注目して、以下の研究を行った。

1) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化

2種類の胚細胞ヒストン (H2aa と H2ba)と、ヒストンシャペロンであるリン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm)を、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)と一緒に MEFs で発現させると、山中 4 因子だけを発現させた場合に比べ、より早期に、かつ 20 倍の高い効率で iPS 細胞が作製できることを明らかにした。さらに、胚細胞ヒストンと P-Npm を Oct3/4 と Klf4 と一緒に発現させるだけで、高い効率で iPS 細胞を作製することができた。また胚細胞ヒストンのノックアウトマウスを解析し、卵子に多量に存在する胚細胞ヒストンは、初期胚の発生に関与する、いわゆる「maternal effect」(母性効果)因子であることを明らかにした。この結果は、これまでに同定された母性効果因子も、胚細胞ヒストンと同様に、リプログラミングを促進する能力を有する可能性を示唆している。以上の結果は、卵子特異的なリプログラミング因子の理解に貢献し、核移植によるリプログラミングを特定の因子で実現するための重要な知見である。

また一連の母性効果因子を発現するレトロウイルスベクターを作製し、山中 4 因子と共に Nanog-GFP MEFs に感染させ、iPS 細胞の作製効率を検討した。その結果、4つの因子が、胚細胞ヒストンと同程度のリプログラミング促進能力を有し、3つが、胚細胞ヒストンより少し弱いリプログラミング促進能力を有することが示された。また、これらの因子を組み合わせると MEFs で発現させると、ICM lineage で発現する Nanog と、trophectoderm lineage で発現する Cdx2 の両方が発現し、blastomere のような totipotent 細胞が出現する可能性が示唆された。

2) ヒト胚細胞ヒストンによるヒト体細胞のリプログラミング

胚細胞ヒストンやヌクレオプラスミンのアミノ酸配列は、ヒトとマウスの間で大きく異なることから、核移植を真似たリプログラミングには種特異性が存在する可能性がある。そこで上記のマウス細胞の場合と同様に、ヒト細胞の場合でも、胚細胞ヒストンが山中4因子による iPS 細胞作製を促進するかどうかを検討し、ヒト胚細胞ヒストンも山中因子によるリプログラミング促進能力を有することが示された。

3) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の分子機構

胚細胞ヒストンの作用メカニズムを明らかにするため、胚細胞ヒストンを含むヌクレオソームの結晶構造を決定し、体細胞型ヒストンに比べ、不安定な構造を持つ事を明らかにした。この結果は、胚細胞ヒストンが open クロマチン構造を形成することを示唆している。またリプログラミング過程で胚細胞ヒストンが結合する領域を ChIP-seq により決定し、胚細胞ヒストンが X 染色体に多く局在することを見いだした。この結果は、理研の小倉グループによる「体細胞移植によるリプログラミングが Xist 変異により促進される」(Science 2010)という最近の結果と一致しているが、そのメカニズムは今後の興味深い問題である。

4) 胚細胞ヒストンの生理機能の解析

2種類の胚細胞ヒストンの変異マウスを解析し、卵子の胚細胞ヒストンは初期発生に関与すること、すなわち胚細胞ヒストンは母性効果因子であることを明らかにした。また変異マウスは精子形成異常を呈し、spermatocyto での meiosis II、および spermiogenesis でのヒストンから Transition proteins (TNPs)への置換不全を示すことを明らかにした。このように胚細胞ヒストンは初期胚や精細胞形成時の生体内でのゲノムリプログラミングに関与することが示された。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 胚細胞ヒストンによる新たなリプログラミング機構

概要:

卵子に多量に存在する胚細胞ヒストンが、初期胚の発生に関与する、いわゆる「maternal effect」(母性効果)因子であることを明らかに、かつし山中因子によるリプログラミングを促進することを明らかにした。胚細胞ヒストンはオープンクロマチン構造を形成し、リプログラミング過程で X 染色体に多く局在することを見いだした。この結果は、胚細胞ヒストンを用いたリプログラミング機構が核移植に似ていることを示唆しており、リプログラミングの新たなメカニズムの理解に繋がるものである。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 胚細胞ヒストンによるリプログラミングの促進

概要:

2 種類の胚細胞ヒストンと、ヒストンシャペロンであるリン酸化型ヌクレオプラスミンを、山中 4 因子と一緒に MEFs で発現させると、より早期に、かつ 27 倍の高い効率で iPS 細胞が作製できた。さらに、胚細胞ヒストンと P-Npm を Oct3/4 と Klf4 と一緒に発現させるだけで、iPS 細胞を作製できた。このように、この方法はリプログラミング効率が低い細胞から iPS 細胞を作成する場合に有用である。

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「石井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
石井 俊輔	(独) 理化学研究所石井分子遺伝学研究室	上席研究員	H20.6～
品川 敏恵	同上	専任研究員	H20.6～
野村 照明	同上	前任研究員	H20.6～H24.3
高木 豪	同上	前任研究員	H20.6～H23.3
李 霞	同上	国際特別研究員	H21.4～H22.3
吉田 圭介	同上	特別研究員	H22.4～H25.3
塚本 大輔	同上	特別研究員	H21.4～H25.3
李 棟	同上	特別研究員	H22.4～
王 強	同上	特別研究員	H25.4～
鄭 祉殷	同上	特別研究員	H21.4～H22.3
石井 知恵	同上	協力技術員	H20.6～H22.9
飯島 由子	同上	協力技術員	H20.6～
丸山 裕子	同上	テクニカルスタッフ	H20.6～
吉波 香織	同上	テクニカルスタッフ	H20.6～
竹村 めぐみ	同上	テクニカルスタッフ	H20.6～
長崎 会美	同上	実験補助パート タイマー	H20.6～
牛木 亜季	同上	実験補助パート タイマー	H22.4～H22.12
田畑 考統	同上	筑波大学連携大 学院生 D4	H20.6～H21.3
江郷 彩子	同上	筑波大学連携大 学院生 D4	H20.6～H22.3
中井 大助	同上	筑波大学連携大 学院生 M2	H20.6～H22.3
堂元 沙織	同上	筑波大学連携大 学院生 M2	H20.6～H22.3
都丸 千夏	同上	筑波大学連携大 学院生 M1	H21.4～H23.3

研究項目

- ・胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の分子機構
- ・胚細胞ヒストンと多分化能との関連→胚細胞ヒストンの生理機能の解析
- ・胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化
- ・ヒトへの応用

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

以下のグループとの共同研究を実施した。

小倉淳郎グループ(理研・筑波): 核移植によるリプログラミング

白鬚克彦グループ(東大・分生研): ChIP-seq 解析

Thirumananeri Kumarevelグループ(理研・播磨): 結晶構造解析

§ 3. 研究実施内容及び成果

1) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化

i) 胚細胞ヒストンは、卵子、精巣、受精卵に多量に存在し、内部細胞塊への分化と共に減少する。

2種類の胚細胞ヒストン H2aa と H2ba の発現レベルを mRNA レベル、タンパク質レベルで解析した。これらの胚細胞ヒストンは卵子と精巣だけでなく、受精卵でも非常に高いレベルで存在し、8細胞期までに徐々に低下する(図1)。胚細胞ヒストンは、内部細胞塊や ES 細胞でも、低いながらも有意に存在しており、その存在量が分化と共に低下し、体細胞ではほとんど検出できない。このように胚細胞ヒストンの発現は、細胞の全能性、多分化能と関連しているように見える。

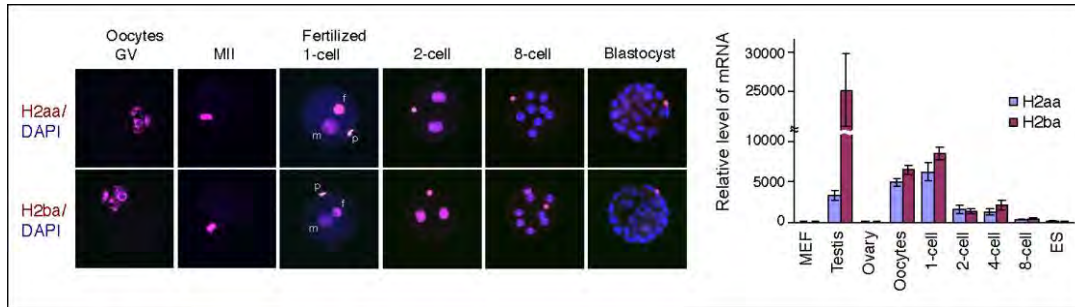


図1. 胚細胞ヒストンの発現。抗体染色(左)と qRT-PCR(右)により調べた。

ii) 胚細胞ヒストンは、山中4因子による iPS 細胞の作製効率を顕著に促進する。

2種類の胚細胞ヒストン (H2aa と H2ba) と、卵子に存在するヒストンシャペロンであるリン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm2) を、山中4因子 (Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) と一緒に MEFs で発現させると、山中4因子だけを発現させた場合に比べ、より早期に、かつ 20 倍の高い効率で iPS 細胞が作製できた(図2)。また胚細胞ヒストン欠損細胞では、山中因子による iPS 細胞作成効率が、約 1/5 に低下していた。

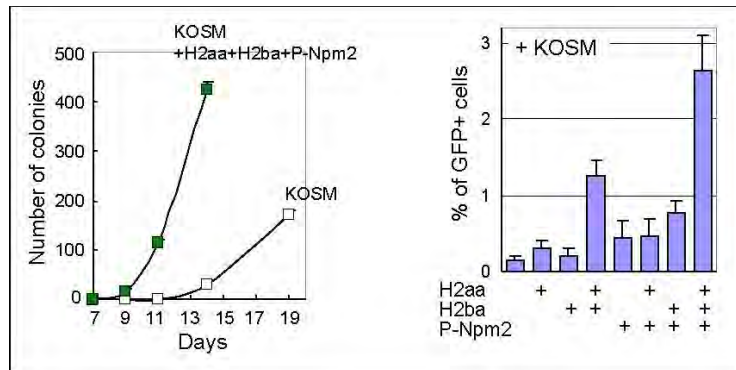


図2. Nanog-GFP MEFs に、山中4因子 (KOSM)、胚細胞ヒストン、リン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm) 発現ベクターを導入して、GFP+細胞コロニー形成の時間経過(左)と産生細胞数(右)を調べた。

iii) 胚細胞ヒストン、P-Npm2、Klf4、Oct3/4 の組み合わせで、iPS 細胞を作製できる。

胚細胞ヒストンと山中4因子との様々な組み合わせを検討した結果、Klf4 と Oct3/4 だけでは iPS 細胞は作製できないが、この2つの因子に胚細胞ヒストンとリン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm2) とを加えると、高い効率で iPS 細胞を作製できた(図3左)。この iPS 細胞は ES 細胞と同様の遺伝子発現パターンを持つ事、Oct3/4、Nanog 遺伝子などのメチル化も顕著に低下していることを確認した。また、この iPS 細胞を用いてキメラマウスを作製し、この iPS 細胞が生殖細胞系列を含む種々の細胞組織に分化できる能力を持つことを確認した(図3右)。

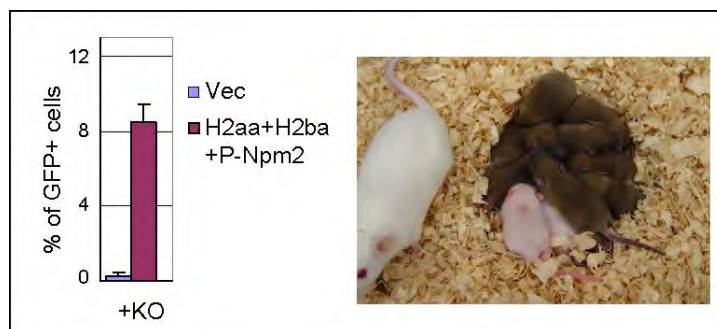


図3. Nanog-GFP MEFs に、Klf4、Oct3/4、胚細胞ヒストン、リン酸化ヌクレオプラスミン (P-Npm) 発現ベクターを導入して、GFP+細胞の形成の効率を調べた(左)。また得られた iPS 細胞を用いてキメラマウスを作製し、生殖細胞に分化する能力を持つことを確認した(右)。

2) ヒト胚細胞ヒストンによるヒト体細胞のリプログラミング

胚細胞ヒストンやヌクレオプラスミンのアミノ酸配列は、ヒトとマウスの間で大きく異なることから、核移植を真似たリプログラミングには種特異性が存在する可能性がある。そこで上記のマウス細胞の場合と同様に、ヒト細胞の場合でも、胚細胞ヒストンが山中4因子による iPS 細胞作製を促進するかどうかを検討し、ヒト胚細胞ヒストンも山中因子によるリプログラミング促進能力を有することが示された。

3) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の分子機構

胚細胞ヒストンと体細胞ヒストンとに、異なるアフィニティーで結合する因子を同定し、いくつかの因子がリプログラミングを促進することを見出した。また、胚細胞ヒストンの作用メカニズムを明らかにするため、胚細胞ヒストンを含むヌクレオソームの結晶構造を決定し、体細胞型ヒストンに比べ、不安定な構造を持つ事を明らかにした。この結果は、胚細胞ヒストンが open クロマチン構造を形成することを示唆している。またリプログラミング過程で胚細胞ヒストンが結合する領域を ChIP-seq により決定し、胚細胞ヒストンが X 染色体に多く局在することを見いだした。この結果は、理研の小倉グループによる「体細胞移植によるリプログラミングが Xist 変異により促進される」(Science 2010) という最近の結果と一致しているが、そのメカニズムは今後の興味深い問題である。

4) 胚細胞ヒストンの生理機能の解析

2種類の胚細胞ヒストン遺伝子を欠損する雌マウスは一見正常である。しかし、この雌マウスの卵子から生じた受精卵は Balstocyst までの初期発生過程が正常に進まないことが示された(図4)。そして単偽発生を含むいくつかの実験から、胚細胞ヒストンは、受精卵における雄核のクロマチン構造変化に重要な役割を果たすことが示された。このように卵子の胚細胞ヒストンは初期発生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

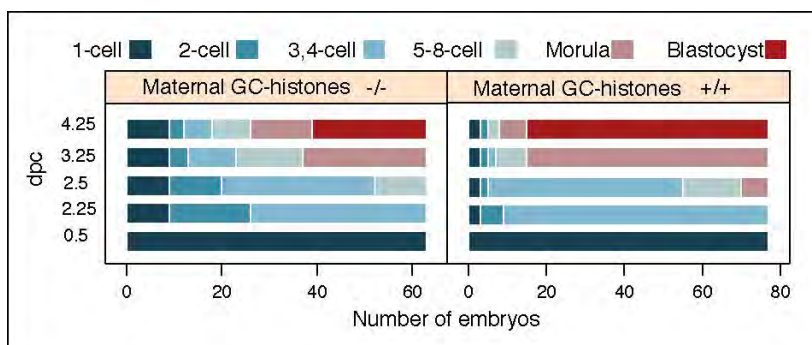


図4. ノックアウトマウス(左)、野生型(右)の雌マウスと、野生型雄マウスを交配後、出現する1-cellからBlastocystまでの数を、時間を追って調べた。

さらに変異マウスの卵子やそれから生じた受精卵では、核小体が形成されていなかった。同様の表現型はスクレオプラスミンの変異マウスでも報告されており(Burns et al, Science, 2003)、また卵子の核小体が初期発生に必須であることも報告されている(Ogushi et al, Science, 2008)。

また2種類の胚細胞ヒストン遺伝子を欠損する雄マウスは不妊であった。精巣では、ほとんど成熟精子が検出されず、多くの pachytene 細胞が分化異常を呈し、spermatid に分化した一部の細胞も、そこで分化を停止していた(図5)。pachytene 細胞では、synapse の形成不全が観察され、さらに spermiogenesis の段階では、ヒストンの Transition proteins (TNPs) への置換が正常に行われていなかった。このように胚細胞ヒストンは初期胚や精細胞形成時の生体内でのゲノムプログラミングに関与することが示された。

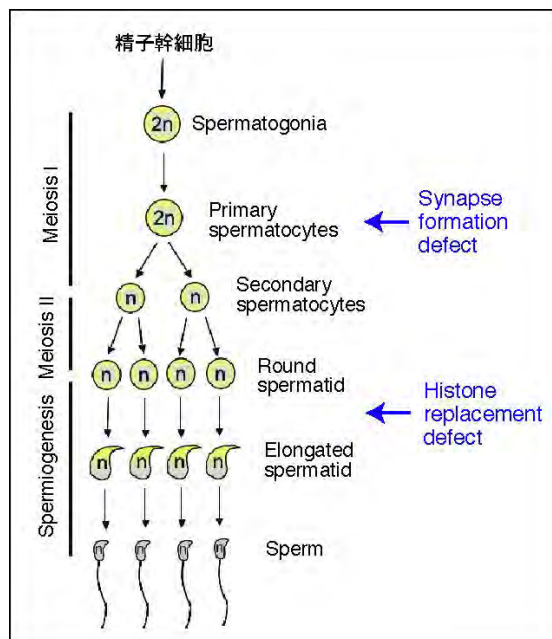


図5. 精子形成過程と、胚細胞ヒストン欠損マウスで見られる異常。

§ 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 9件)

1. Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, Ogura H, Yamada K, Chatton B and Ishii S. Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.* **29**, 196-208, (2010). (DOI:10.1038/emboj.2009.318)
2. Egoh A, Nosuke Kaneshashi S, Kanei-Ishii C, Nomura T and Ishii S. Ribosomal protein L4 positively regulates activity of a c-myc proto-oncogene product. *Genes Cells* **15**, 829-841 (2010). (DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01421.x)
3. Maekawa T, Jin W and Ishii S. The role of ATF-2 family transcription factors in adipocyte differentiation: antiobesity effects of p38 inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 613-625 (2010). (DOI:10.1128/MCB.00685-09)
4. Seong KH, Akimaru H, Dai P, Nomura T, Okada M and Ishii S. Inhibition of the nuclear import of cubitus interruptus by roadkill in the presence of strong hedgehog signal. *PLoS One* **5**, e15365, 1-12 (2010). (DOI:10.1016/j.cell.2011.05.029)
5. Jones DC, Schweitzer MN, Wein M, Sigrist K, Takagi T, Ishii S and Glimcher LH. Uncoupling of growth plate maturation and bone formation in mice lacking both Schnurri-2 and Schnurri-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8254-8258. (2011). (DOI:10.1073/pnas.1003727107)
6. Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S and Glimcher LH. Dampening of death pathways by Schnurri-2 is essential for T cell development. *Nature*, **472**, 105-109, (2011). (DOI:10.1038/nature09848)
7. Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R and Ishii S. Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell*, **145**, 1049-1061, (2011). (DOI:10.1016/j.cell.2011.05.029)
8. Kanei-Ishii C, Nomura T, Egoh A, and Ishii S. Fbxw5 suppresses nuclear c-Myb activity via DDB1-Cul4-Rbx1 ligase-mediated sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**, 59-64 (2012). (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.08.032)
9. Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S. Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **14**, 217-227 (2014). (DOI: 10.1016/j.stem.2013.12.015)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Seong KH, Maekawa T, and Ishii S. Inheritance and memory of stress-induced epigenome change: roles played by the ATF-2 family of transcription factors. *Genes Cells* **17**, 249-63 (2012). (Review) (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01587.x.)

(3)知財出願

① 海外出願 (1件)

1. 発明の名称: Methods for generating nuclear reprogrammed cell, and use thereof.
発明者: 石井俊輔、品川敏恵
出願日: 2012/8/29
出願番号: 13/597854
出願国: 米国

(4)受賞・報道等

① マスコミ(新聞・TV等)報道

プレス発表: 卵子の異型ヒストンが iPS 細胞の作製を促す

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140207_1/

発表内容は以下の通り。

アミノ酸配列が通常のヒストンと異なる「異型ヒストン」を iPS 細胞(人工多能性幹細胞)の作製に用いると、核移植に似たメカニズムを介して、iPS 細胞の作製効率が約 20 倍上昇することを明らかにした。

朝日、産経、日経各紙報道

§ 5. 最後に

胚細胞ヒストン欠損細胞では、山中因子による iPS 細胞作成効率が著しく低下すること、また胚細胞ヒストンがリプログラミング過程で X 染色体上に多く局在することから、未知のリプログラミング機構の理解に繋がると考えている。また、この研究から、他の「母性効果因子」も重要なリプログラミング因子候補であることが分かってきたことは、特筆すべきことだろうと考えている。